

## PRODUCTION OF ANG-KHAK COLORANT

Patent Number: JP7274978

Publication date: 1995-10-24

Inventor(s): ENDO AKIRA; others: 01

Applicant(s):: BIO KOSUMOSU:KK

Requested Patent:  JP7274978

Application Number: JP19940074722 19940413

Priority Number(s):

IPC Classification: C12P1/02 ; C09B61/00

EC Classification:

Equivalents:

### Abstract

PURPOSE:To obtain an ang-khak colorant not containing citrinin and excellent in safety as a food additive.

CONSTITUTION:This method for producing an ang-khak colorant substantially not containing citrinin is carried out by using a strain belonging to Monascus pilosus group or Monascus rubber group or by using a strain belonging to Monascus selected from Monascus purpureus, Monascus albidus, Monascus rubiginosus and Monascus major. A method for producing a mutant maintaining a red color productivity without producing citrinin by mutating a strain belonging to Monascus anka and capable of producing a citrinin-containing ang-khak color is also provided.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - I2

EXPRESS MAIL NO.:  
EV327549117US



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-274978

(43)公開日 平成7年(1995)10月24日

51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 P 1/02	Z	7417-4B		
C 09 B 61/00	E			
/ (C 12 P 1/02				
C 12 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平6-74722	(71)出願人	593226869 有限会社バイオコスモス 東京都世田谷区松原3-23-27-203
(22)出願日	平成6年(1994)4月13日	(72)発明者	遠藤 章 東京都杉並区宮前3-2-19
		(72)発明者	村川 茂雄 東京都杉並区善福寺3-19-8
		(74)代理人	弁理士 塩澤 寿夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 紅麹色素の製造方法

(57)【要約】

【構成】 モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を製造する方法、モナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を製造する方法、およびモナスカス・アンカ種に属しシトリニン含有紅麹色素を產生する菌株を変異させてシトリニンを產生せずに紅色系生産能を保持した変異株を製造する方法。

【効果】 本発明の方法により製造した紅麹色素はシトリニンを含有していないので、食品添加物としての安全性に優れているという特徴を有する。

### 【特許請求の範囲】 **アーチ形** **ドーム形** **フランジ**

【請求項1】 モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を製造する方法。

【請求項2】 モナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を製造する方法。

【請求項3】 モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を分離・採取することを特徴とする紅麹色素の製造方法。

【請求項4】 モナスカス・バープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を分離・採取することを特徴とする紅麹色素の製造方法。

【請求項5】 モナスカス・アンカ種に属しシトリニン含有紅麹色素を产生する菌株を変異させてシトリニンを产生せずに紅色系生産能を保持した変異株を製造する方法。

【請求項6】 変異株がモナスカス・アンカ 4478A又はモナスカス・アンカ 4478Bである請求項5記載の方法。

【請求項 7】 モナスカス・アンカ種に属しシトリニンを产生せずに紅色系生産能を保持した菌株。

【請求項8】 モナスカス・アンカ 4478A又はモナスカス・アンカ 4478Bである請求項7記載の菌株。

#### 【発明の詳細な説明】

[0 0 0 1]

【産業上の利

ある。さらに詳しくは、本発明はシトリニン生産能のない紅麹菌を用いる紅麹色素の製造に関する。

### 【従来の技術】

養により生産される紅色系色素を抽出することにより得られる色素である。従来、紅麹色素の生産には、専らモナスカス・アンカ (*Monascus anka*) が利用されてきた。その理由は、この種に色素生産能の高い株が含まれているということにある。モナスカス・アンカを培養して得られる紅麹は、古くから東洋、特に中国と東南アジア諸国において、漢方薬、食品の保存剤、並びに酒類と漬物等の製造に広く利用されている。近年、本菌の生産する紅色系色素は天然色素としてその価値が評価され、水産加工食品をはじめとする多くの食品の着色剤として利用されるようになった（遠藤 章：発酵と工業43巻、pp. 544-552、1985）。

〔0003〕最近、本発明者らは、従来紅麹色素の生産 50 る。

に利用されてきた紅麹菌のほとんどが、米の黄色カビが產生する毒素として知られるシトリニン(Citrinin: 3R-trans-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid: Merck Index 11th edition, 2329)を生産していることを新たに発見した。シトリニンは強力な毒素であり(総説として、齊藤ら "Yellowed Rice Toxins," Microbial Toxins: A. Ciegler, S. Kadis, A. Aji 編、アカデミック・プレス社、ニューヨーク、1971年、VI巻、pp. 357-367を参照)

10 、本来、食品に添加されるべき紅麹色素には微量といえども含有されてはならない物質である。しかしながら、従来食用に供されてきた紅麹色素の多くのものに微量ではあるがシトリニンが含有されている。この事実は極めて深刻であり、このような紅麹色素にかえてシトリニンを含有しない紅麹色素を緊急に提供する必要がある。

[0004]

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、シトリニンを含有しない紅麹色素を提供することにある。本発明の別の目的は、シトリニンを含有しない紅麹色素を产生する紅麹菌を提供することにある。さらに本発明は、シトリニンを含有しない紅麹色素を产生する紅麹菌を培養し、培養物からシトリニンを含有しない紅麹色素を分離・精製する方法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】本発明者は上記の目的を達成するため、種々の紅麹菌株を収集してシトリニンを生産しない菌株を探査した。その結果、一部の紅麹菌株がシトリニンを生産しないことを見出し、本発明を完成するに至った。

〔0005〕すなわち本発明は、モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を製造する方法、およびモナスカス・バーブレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を製造する方法を提供するものである。

40 【0006】本発明の別の観点からは、モナスカス・ビロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を分離・採取することを特徴とする紅麹色素の製造方法、及びモナスカス・バーブレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麹色素を分離・採取することを特徴とする紅麹色素の製造方法が提供される。  
50

【0007】また、本発明は、モナスカス・アンカ種に属しシトリニン含有紅麹色素を產生する菌株を変異させてシトリニンを產生せずに紅色系生産能を保持した変異株を製造する方法を提供するものであり、その一態様として、変異株がモナスカス・アンカ 4478A又はモナスカス・アンカ 4478Bである上記方法が提供される。さらに、モナスカス・アンカ種に属しシトリニンを產生せずに紅色系生産能を保持した菌株、並びにモナスカス・アンカ 4478A又はモナスカス・アンカ 4478Bである上記菌株も提供される。

【0008】モナスカス属のシトリニン生産性の比較  
シュクロース 3 %、ポリペプトン 1 %、酒石酸 0.1 %、L-アスパラギン 0.3 %、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %、MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.05 %、消泡剤 (CB442) 0.01 % (pH 4.4) からなる培地を坂口フラスコ (500 ml 容) に 100 ml ずつ分注し、120 °Cで 20 分間滅菌した。この培地に斜面培養した各種モナスカス属菌株を接種して、25°Cで10日間振とう培養した。培養液 10 ml を濾過し、その液体を pH2~3 に調整後、10 ml の酢酸エチルで2 度抽出した。抽出液を無水硫酸ソーダで脱水後に減圧乾固し、1 ml のメタノールに溶解した。メタノール溶液を 0°Cで10分間遠心 (10,000×g) した上清を検定に供した。

【0009】合成培地等を用いた場合のように培養液に夾雜物が少ない場合には、培養濾液を 10 ml に調製した後、10 ml のメタノールを加えて冷却し、10分間遠心 (10,000×g) して上清を取り検定に供した。十分に母液を除いた菌体 (培養液 10ml 相当) を 5 ml のメタノー

ルで 2回抽出し、抽出液を減圧乾固して 1 ml のメタノールに溶解した。上記の条件で冷却遠心した上清を検定に供した。上述の条件で調製した試料 (培養液相当量として 10 ~ 50 μl) を用い下記の件で分析した。

カラム：シリカ C<sub>18</sub> (Inertsil ODS 6 × 250 mm)

流動相：アセトニトリル : 0.1 % リン酸水 = 55 : 45

流速 : 1.0 ml/min.

検出器：UVマルチチャンネル検出器、235 nm

【0010】上記条件でシトリニンの保持時間は14~15分であった。試料中のシトリニンはピークの保持時間及びピークの UV 吸収パターンより確認してピーク面積により定量し、同定は質量分析、NMR 分析等により行った。上記条件での標準シトリニン試料の検出限界は 0.05 μg/injection 以下であった。シトリニンの検出結果を表1に示す。なお、ホークスワースらの提案により、モナスカス属をモナスカス・ピロサス・グループ、モナスカス・バーブレウス・グループ及びモナスカス・ルバー・グループの 3 グループに整理して示した (D.L. ホークスワース、J.I. ピット、オーストラリアン・ジャーナル・オブ・ボタニー、31巻、51頁、1983年)。さらに、シトリニンの生産性は培地組成の異なる他の培地 (2種) で検討したところ、同様の成績が得られた。また、培養温度を 30°C にしてもシトリニンの生産性に変化はなかつた。

【0011】

【表1】

#### モナスカス属のシトリニンの生産性

モナスカス ( <i>Monascus</i> ) 種	シトリニン生産量 (μg/ml)
M. ピロサス ( <i>pilosus</i> ) グループ	
M. ピロサス ( <i>pilosus</i> ) IFO 4480, 4520	いずれも 0
M. プビゲルス ( <i>pubigerus</i> ) IFO 4521	0
M. セロルベセンス ( <i>serorubescens</i> ) IFO 4487, 4525	いずれも 0
M. バーブレウス ( <i>purpureus</i> ) グループ	
M. バーブレウス ( <i>purpureus</i> ) IFO 4513, AHU 9096, 9451 ATCC 6405, 16436, 16385, 16386, 16365, 16427	すべて 0
M. アンカ ( <i>anka</i> ) IFO 4478 IFO 6540	235 ~ 1
IFO 30873	35
IFO 32228	18
IFO 32316	13
M. アンカ ( <i>anka</i> ) var. ルベルス ( <i>rubellus</i> ) IFO 5965 IFO 6085	16 0
M. カオリアング ( <i>kaoliang</i> ) MO-F1	47
M. アルビズス ( <i>albidus</i> ) IFO 4489	0
M. ルビギノサス ( <i>ruginosus</i> ) IFO 4484	0

5

M. メイジャー (major) IFO 4485

6

0

## M. ルバー (ruber) グループ

M. ルバー (ruber) IFO 4492	ほか 10株	すべて 0
M. パキシイ (paxii) IFO 8201		0
M. フリギノサス (fuliginosus) IFO 4483		0
M. ビトレウス (vitreus) IFO 4532, 7537		いずれも 0
M. バルケリ (barkeri) ATCC 16966		0

その他、日本および近隣諸国で紅麹色素製造に現在使用されている

## M. アンカ (anka) に属するもの

M. エスピー (sp.) T1	(タイ)	112
343	(日本)	156
030	(日本)	277
12N	(日本)	61
202-13	(日本)	13
H4	(台湾)	3
T4	(台湾)	32
C2	(カンボジア)	102
VN-3	(ベトナム)	2

【0012】表1に示された結果から明らかなるとおり、モナスカス・アンカに属する菌株は、試験した全株にシトリニン生産能が認められた。現在紅麹色素の製造に用いられている株はいずれもモナスカス・アンカに分類されるものである。これに反して、モナスカス・ビロサス・グループ、モナスカス・ルバー・グループに属する菌株にはシトリニン生産性がまったく認められなかった。従って、モナスカス・ビロサス・グループ、モナスカス・ルバー・グループに属する菌株はいずれも本発明に用いることができる。また、モナスカス・バーブレウス・グループの中では、モナスカス・バーブレウス種は試験した9株がすべてシトリニンを生産していなかった。従って、本発明にはモナスカス・バーブレウス種に属する菌株を用いることもできる。さらに、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、またはモナスカス・メイジャー種に属する菌株も上記試験においてシトリニンを生産しておらず、本発明に用いることができる。

【0013】上記の表1に示される菌株のうち、シトリニンを產生しない株（シトリニン生産量が0と記載されたもの）は、いずれも本発明に好適に用いることのできる菌株の具体例であるが、本発明に使用される菌株はこれらに限定されることはない。本発明には、実質的にシトリニンが產生されない菌株、具体的にいえば、シトリニンの生産量が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくは $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、特に好ましくはシトリニンの产生が全くないか、あるいは产生量が $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の菌株を用いることができる。シトリニンの产生がなく、かつ紅麹色素の色彩が良好であるという観点から、本発明には、モナスカ

ス・バーブレウス種に属する菌株を好適に用いることができる。例えば、表1に記載されたモナスカス・バーブレウス IFO 4513, AHU 9096, 9451, ATCC 6405, 16436, 16385, 16386, 16365, 16427等は、本発明に特に好適に用いることができる菌株である。

【0014】本発明に従って、上記の菌株を用いてシトリニンを含有しない紅麹色素を製造するには、当業者に周知の方法により上記菌株を培養し、培養物からそれ自体公知の方法により紅麹色素を分離・採取すればよい。その例を以下の実施例に具体的に示すが、本発明の方法はこれらの方法に限定されることなく、当業者はこの実施例を基にして菌株に応じて培養条件を適宜選択し、シトリニンを含有しない紅麹色素を製造することができる。

【0015】また、本発明の別な態様によれば、シトリニン生産能を有するモナスカス・アンカを各種変異剤、例えば紫外線照射、ニトロソグアニジン、亜硝酸、アルキル化剤、ヒドロキシアミン等による単独または組合せ処理により処理して、シトリニンを生産せずに紅色系生産能を保持した変異株を产生する方法、並びに該方法により製造される変異株が提供される。

【0016】モナスカス・アンカがシトリニンを生産することは、本発明の研究によりはじめて明らかにされたことであり、従来全く知られていないかった。また、モナスカス・アンカによるシトリニンの生合成経路と紅色系色素の生合成経路の相互関係に関する知見は従来皆無である。従って、本菌のシトリニン生産能を失わせて紅色系色素の生産能を保持させることができか否かは、従来の知見からは当業者にも全く予測できないことである。

本発明の方法によりシトリニン産生能を有するモナスカス・アンカを処理するための方法としては、それ自体公知の変異株製造方法を用いることができる。例えば、各種変異剤、例えば紫外線照射、ニトロソグアニジン、亜硝酸、アルキル化剤、ヒドロキシアミン等による単独または組合せ処理を用いることができるが、これらに限定されることはない。シトリニン産生能を喪失したか否かは、上記の方法により検定すればよい。

## 【0017】

## 【実施例】

## 実施例1

シュークロース 10%、ペプトン 1%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、酒石酸 0.1%、アスパラギン 0.3% (pH 4.4) からなる液体培地 100 ml を坂口フラスコ (500 ml 容) にとり、滅菌後、モナスカス・ピロサス IF0 4480 株を接種して 30 °C で 10 日間振とう培養した。培養液を濾過して菌体を集めた。この菌体に 70% エタノール 50ml 加えて 3 時間攪拌抽出し、抽出液を濾過して濾液を採取した。この濾液を減圧下で濃縮乾固し、シトリニンを含まない粗紅麹色素 110 mg を得た。

## 実施例2

パン粉 5%、グルコース 3% からなる液体培地 100 ml を 500 ml 容三角フラスコにとり、常法により滅菌後、モナスカス・バーブレウス IF0 4513 を接種して 30 °C で 10 日間培養した。培養物から実施例1の方法に準じてシトリニンを含まない粗紅麹色素 180 mg を得た。

## 【0018】実施例3

モナスカス・アンカ IF0 4478 株 (表1、シトリニン生産能 235 μg/ml) を常法により紫外線で処理した。生育した 1,200 株の中から、紅麹色素生産能を保持しており、かつシトリニン生産能が 1 μg/ml 以下の変異株 1 株 (4478A 株) を得た。

## 実施例4

実施例3で得た 4478A 株を常法によりニトロソグアニジンで処理した。得られた約 2,000 株の中から、シトリニン生産能が 0.1 μg/ml 以下の変異株 (4478B) を取得した。

## 【0019】

【発明の効果】本発明の方法により製造した紅麹色素はシトリニンを含有しておらず、食品添加物としての安全性に優れているという特徴を有するので有用である。

